Erlangen 1939

Aus dem chemischen Laboratorium der medizinischen Klinik Erlangen (Dir. Professor Dr. R. Greving — ausgeführt unter dem Direktorat von Professor Dr. L. R. Müller).

Quantitative Untersuchungen über den Adenylsäureaufbau in der Taubenleber.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

einer

Hohen Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Alexanders-Universität Erlangen

vorgelegt von

Georg Gumprecht

aus Frauenaurach

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juni 1938.

1939

Buchdruckerei Karl Döres, Erlangen, Jägerstraße 3.

Uebersicht:

Einleitung 5
I. Bestimmung von freien und gebundenen Purinen 6
II. Ausschaltung von Fehlerquellen bei der Purinbestimmung . . 8
III. Versuche zur Adenylsäuresynthese 9
Beschreibung der Versuche 11
Zusammenfassung 16
Literatur 18

Als eine der wichtigsten Substanzen des Nucleinstoffwechsels hat sich durch die Forschung der letzten Jahre die Adenylsäure erwiesen. Ihre blutdruckregulierende Wirkung wurde besonders durch die Arbeiten von K. Zipf (1) hervorgehoben und dadurch zugleich der Zweck ihres Vorkommens im normalen Serum geklärt. Ihre Bedeutung als Co-Dehydrase konnte v. Euler (2) und H. J. Deuticke (3) experimentell nachweisen.

Außerdem ist bekannt, daß Adenosintriphosphorsäure, eine Verbindung von Adenylsäure mit Pyrophosphorsäure, als Phosphatüberträger für den Muskelstoffwechsel in Frage kommt. Ueber den Ort und den Mechanismus der Synthese dieser Verbindungen aus ihren Bausteinen Adenin, d-Ribose und Phosphorsäure ist bis heute so gut wie nichts bekannt. Die experimentelle Klärung des Mechanismus einiger weniger biochemischer Synthesen gelang in der Stoffwechselforschung nur mit Hilfe überlebender Organgewebsschnitte. Wir versuchten deshalb auch in den Aufbau der Adenylsäure mit Hilfe überlebender Organschnitte Einblick zu gewinnen. Die folgende Bearbeitung benützte Tatsachen über den Nucleinstoffwechsel der Taube als Voraussetzung, die W. Schuler und W. Reindel (4) bei der experimentellen Untersuchung der Purinsynthese im Taubenorganismus gefunden haben:

1. In keinem Organ der Taube findet die vom Säuger-Organismus (ausgenommen den des Menschen) bekannte Urikolyse statt. Unter Urikolyse versteht man den im Säuger-Organismus stattfindenden oxydativen Abbau der durch Spaltung der zusammengesetzten Purinkörper auftretenden Harnsäure. Dabei entsteht hauptsächlich in der Säuger-Leber aus Harnsäure Allantoin.

2. In der Leber der Taube findet keine oxydative Umwandlung freier Purine in Harnsäure statt, dagegen bei Abwesenheit von viel Adenin ein Abbau von Nucleosiden zu freien Purinen. Von Mononucleotiden, d. h. Verbindungen von Nucleosiden mit Phosphorsäure, vermag Taubenleber keine Phosphorsäure abzuspalten, da es ihr an Nucleophosphatase fehlt.

3. Schuler und Reindel (4) konnten auch zeigen, daß überlebende Pankreasschnitte Nucleotide nicht zu spalten vermögen, daß dagegen die Aufspaltung von Nucleosiden und die oxydative Um-

wandlung der dabei entstehenden freien Purine besonders bei Anwesenheit von Methylenblau quantitativ gelingt. Diese Tatsache hat zur Ausarbeitung einer quantitativen Bestimmungsmethode von Nucleosiden und freien Purinen geführt (5).

4. Ueberlebende Taubennierenschnitte vermögen Mononucleotide bis zur Harnsäure abzubauen, folglich auch Nucleoside und freie Purine in Harnsäure umzuwandeln.

Diese Ergebnisse besagen also über den die Purinkörper abbauenden Fermentgehalt der untersuchten Organe folgendes: Taubenleber besitzt keine mononucleotidspaltende Nucleotidase, keine Xanthindehydrase, dagegen nucleosidspaltende Nucleosidasen. Taubenpankreas besitzt ebenfalls keine Nucleotidasen, dagegen Nucleosidasen, Guanindesaminase und Xanthindehydrase. Taubenniere besitzt sicher Nucleotidasen, Nucleosidasen und Fermente, die freie Purine in Harnsäure umwandeln.

Da sich die vorliegende Arbeit besonders mit der experimentellen Untersuchung des auf- und abbauenden Stoffwechsels zusammengesetzter adeninhaltiger Purinkörper befassen sollte, war es zunächst notwendig analytische Methoden ausfindig zu machen, mit Hilfe deren es gelingt, eine quantitative Trennung und Bestimmung von Adenylsäure neben Adenosin und freien Purinen zu ermöglichen. Erst mit Hilfe dieser analytischen Grundlagen, deren Bearbeitung auch eine Nachprüfung der schon in der Literatur bekannten Bestimmungsmethoden für Purinkörper notwendig machte, war eine aussichtsreiche Bearbeitung der hier erwähnten Probleme zu erwarten.

I. Bestimmung von freien und gebundenen Purinen.

Bei der Nachuntersuchung der von Thannhauser und Czoniczer (6) beschriebenen Methode zur Bestimmung freier und gebundener Purine ergab sich folgendes:

Eingewogene Mengen der freien Purine Adenin, Guanin, Hypoxanthin und Xanthin werden mit Hilfe von Kupfersulfat und Natriumsulfit quantitativ als Cuprosalze gefällt. Bei einer Menge von ca. 5 mg Purin gelingt es mikromäßig den Stickstoffgehalt der Purine auf eine Genauigkeit von 3% zu bestimmen. Dagegen ist an eine quantitative Fällung der Mononucleotide und Nucleoside mit Hilfe von Kupfersulfat und Natriumbisulfit nicht zu denken. Die Behauptung von Thannhauser, daß sich eine Fällung der Mononucleotide gemeinsam mit den freien Purinen mit Hilfe von Kupfersulfat und Natriumbisulfit ermöglichen ließe, ist falsch, denn ein-

gewogene Mengen von Adenylsäure ließen sich bei Ausfällung mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit nur in wechselnder Menge im Höchstfalle bis zu 33% finden, Adenosin und Guanosin in einer Menge von nur ca. 10%. Zur Ermittlung des Stickstoffgehalts wurden die Niederschläge mit Hilfe der Kjeldahl'schen Methode auf ihren Stickstoffgehalt untersucht.

Die Fällung der Purinkörper mit ammoniakalischer Silbernitratlösung wurde auch einer kritischen Bearbeitung unterzogen. Wir fanden, daß alle freien Purine mit Hilfe dieser Methode quantitativ bestimmt werden können. Adenylsäure und Adenosin geben dagegen mit ammoniakalischer Silbernitratlösung keinen sichtbaren Niederschlag. Diese Tatsache veranlaßte uns Versuche anzustellen, ob mit Hilfe ammoniakalischer Silbernitratlösung eine quantitative Abtrennung der freien Purine von Adenosin und Adenylsäure sich verwirklichen läßt. Es zeigte sich bei Bestimmung eingewogener Mengen von Adenylsäure und freien Purinen, daß es tatsächlich gelingt, mit Hilfe ammoniakalischer Silbernitratlösung Adenylsäure und Adenosin quantitativ von sämtlichen freien Purinen abzutrennen; der in ammoniakalischer Lösung gefällte Silberniederschlag zeigte nach Vertreibung des Ammoniaks mit Baryumkarbonat immer nur einen den freien Purinen entsprechenden Stickstoffgehalt.

Damit ist erwiesen, daß es mit Hilfe von ammoniakalischer Silbernitratlösung gelingt, Adenylsäure und Adenosin quantitativ von den freien Purinen Adenin, Guanin, Hypoxanthin und Xanthin abzutrennen. Weitere Versuche zeigten, daß sich Adenylsäure und Adenosin nach Aufspaltung mit 2%iger Schwefelsäure in Form von freiem Adenin nach Fällung mit Kupfer- oder Silberlösung quantitativ bestimmen lassen. Die Säurespaltung der zusammengesetzten Purine wurde nach G. Schmidt (7) durchgeführt.

Durch diese zeitraubenden, aber unbedingt notwendigen Untersuchungen über Mikrofällungsmethoden zur Trennung und Bestimmung der für uns in Frage kommenden Purinkörper wurde erst die Grundlage für die Bearbeitung der hier in Frage kommenden Stoffwechselvorgänge geschaffen.

Thannhauser gibt zur Trennung der Mononucleotide von den Nucleosiden und freien Purinen die Fällung mit Uranylacetat an, von dem bekannt ist, daß es mit Phosphorsäureverbindungen unlösliche Niederschläge gibt. Wir konnten zwar zeigen, daß Adenylsäure quantitativ mit Uranylacetatlösung ausgefällt wird, daß aber Uranyl-Phosphorsäureverbindungen besonders in phosphorsäurehaltigen Gewebsextrakten zugleich freie Purine adsorbieren, die auch nach sorgfältigem Auswaschen mit dest. Wasser nicht mehr

eluiert werden können. Dieser Umstand besagt, daß eine Uranylacetatfällung zur Enteiweißung oder zur Abtrennung von Phosphorsäureverbindungen eine nachfolgende Bestimmung von freien Purinen unzuverlässig macht. (Zu ähnlichen Ergebnissen kommt auch H. Edlbacher (8) bei Bestimmung des Puringehalts von Säugerorganen.) Es wurde daher auf eine Abtrennung der Mononucleotide mit Hilfe von Uranylacetat verzichtet und zur Bestimmung von Nucleosiden und freien Purinen die von Schuler und Reindel (4) ausgearbeitete physiologische Bestimmungsmethode mit Hilfe überlebender Pancreasschnitte der Taube verwandt. Wir bestimmten bei unseren adenin- und adenosinhaltigen Versuchslösungen in einem Teil der Lösung die freien Purine nach Enteiweißung mit Sulfosalizylsäure durch Fällung mit ammoniakalischer Silberlösung, dann in einem anderen Teil der Lösung Nucleoside und freie Purine zusammen mit Hilfe überlebender Taubenpankreasschnitte und endlich den Gesamtpuringehalt durch Fällung nach Säurespaltung eines weiteren Teils der Lösung. Da sich bei der Fällung freier Purine mit ammoniakalischer Silberlösung die zeitraubende Vertreibung des Ammoniaks aus der Lösung erübrigt, wurden alle Purinfällungen mit dieser und nicht mit der Kupfersulfatfällung durchgeführt. Aus dem Unterschied der Werte, die mit Hilfe der 3 verschiedenen Methoden erhalten wurden, ließ sich der Gehalt einer Lösung an Mononucleotid-, Nucleosid- (bzw. Adenosin) und freien Purinstickstoff (bzw. Adenin) und die Veränderung zugesetzten Adenins bzw. Adenosins ermitteln.

II. Ausschaltung von Fehlerquellen bei der Purinbestimmung.

Der Umstand, daß freie Purine teilweise vom Uranylacetatniederschlag mitgerissen werden, machte weitere Versuche darüber notwendig, welche Purine von dem Niederschlag adsorbiert werden, insbesondere über das Verhalten von Adenin in Phosphatpufferlösung. Mehrere Versuche zeigen, daß Adenin als Aminopurin in wechselnder Menge bis zu 30% adsorbiert wird, während die Oxypurine Hypoxanthin und Harnsäure in Phosphatpufferlösung praktisch nicht adsorbiert werden, ihre Bestimmung also durch die Uranylacetatfällung nicht beeinflußt wird.

Die Enteiweißung mit Uranylacetat war für unsere Zwecke unbrauchbar. Wir enteiweißten deshalb mit 20%iger Sulfosalizylsäure. In diesem Zusammenhang dürfte von Interesse sein, daß bei einem Versuche die mit Sulfosalizylsäure gefällte Eiweißmenge gegenüber der mit 20%iger Trichloressigsäure gefällten nur 4% niedriger war.

Da bei unseren Versuchen adenosinhaltige Lösungen auf dem Wasserbad vor der Bestimmung eingeengt werden müssen, war zu prüfen, ob dabei eine Aufspaltung von Adenosin vorliegt. Wird Adenosin 2 Stunden in Phosphatpufferlösung bei ph 8,0 oder 5,0 auf dem Wasserbad behandelt, so konnte keine Spur Adenin mit der Silbernitratfällung nachgewiesen werden, es trat also keine Aufspaltung ein.

III. Versuche zur Adenylsäuresynthese.

Der Adenylsäureaufbau läßt sich erst nach Kenntnis aller in dieses Stoffwechselgebiet gehörenden abbauenden Vorgänge bearbeiten. Da mit überlebenden Leberschnitten der Taube gearbeitet werden sollte, von denen bekannt ist, daß sie weder Mononucleotide noch freie Purine verändern können, war für unsere Zwecke zu untersuchen, wie sie sich gegenüber Adenosin verhalten.

Adenosin wurde in einer Konzentration von 40 mg% in Phosphatpuffer bei 40° 2 Stunden im Thermostaten mit überlebenden Tauben-Leberschnitten geschüttelt. Zur Ermittlung des Puringehaltes der Leberschnitte wurden solche ohne Adenosin genau so behandelt (Leerversuch). Nach dem Versuch wurden die freien Purine mit Hilfe ammoniakalischer Silberlösung bestimmt. Es zeigte sich nach Abzug des Puringehalts des Leerversuches ein Wert, der für entstandenes Hypoxanthin spricht. Daß nicht Adenin, sondern Hypoxanthin als Spaltprodukt auftritt, konnten wir außerdem mit Hilfe der Tatsache nachweisen, daß überlebende Taubenpankreasschnitte wohl Hypoxanthin, nicht aber Adenin in Harnsäure umwandeln können. Versetzt man nämlich die mit Taubenleberschnitten behandelte Adenosinlösung mit Taubenpankreasschnitten, so findet man den größten Teil des Adenosins in Form von Harnsäure, ein Beweis dafür, daß in der Taubenleber eine Aufspaltung von Adenosin erfolgt und daß das entstehende Spaltprodukt nicht Adenin, sondern Hypoxanthin ist. Dies ist ein weiterer Beitrag für die Allgemeingültigkeit der Tatsache, daß Adenin als Abbauprodukt im Nucleinstoffwechsel nicht in Frage kommt und daß es aus seiner Bindung erst nach Desaminierung in Form von Hypoxanthin abgespalten wird.

Bei Zusatz von geringen Mengen von Adenin zur selben Versuchsanordnung zeigt sich eine deutliche Hemmung der Adenosinspaltung. Dieser Umstand könnte in dem Sinne gedeutet werden, daß Adenin rückläufig wieder zu Adenosin synthetisiert wird. Ebenso zeigt sich bei Adeninzusatz eine deutliche Hemmung der Spaltung

von Adenosin und Adenylsäure mit überlebenden Taubennierenschnitten.

Zum Nachweis einer Adenylsäuresynthese aus Adenosin bzw. Adenin wurden weitere Versuche mit überlebenden Leberschnitten ausgeführt. Als Grundlage unseres experimentellen Vorgehens seien hier nochmals folgende Tatsachen erwähnt:

1. In der Taubenleber vollziehen sich folgende Purinstoffwechselvorgänge: Desaminierung von Amino-Nucleotiden, Amino-Nucleosiden und Guanin, Spaltung von Nucleosiden, wie oben bewiesen wurde. Die Taubenleber besitzt also sämtliche Purindesamidasen und Nucleosidasen. Außerdem vermag Taubenleber den Purinring aus Ammoniak und einer Kohlenstoffverbindung zu synthetisieren. (9)

2. Taubenpankreas vermag sicher Nucleoside und Guanin zu desaminieren, außerdem die Oxypurine quantitativ in Harnsäure umzuwandeln. Es besitzt also Purindesamidasen und Xanthindehydrase.

3. Adenylsäuren und Adenosin lassen sich mit Hilfe ammoniakalischer Silberlösung quantitativ von den freien Purinen abtrennen, wobei nur die freien Purine quantitativ als Silbersalze gefällt werden. Nach Vertreibung anhaftenden Ammoniaks mit Baryumkarbonat läßt sich der Purinstickstoffgehalt der Niederschläge nach Kjeldahl bestimmen.

Findet in der Taubenleber ein Aufbau von Adenosin zu Adenylsäure statt, so müßte sich nach Behandlung von Adenosin mit überlebenden Leberschnitten nur noch ein Teil des Adenosins in der Lösung nachweisen lassen. Zu diesem Zwecke untersuchten wir die Lösung mit überlebenden Pankreasschnitten. Wäre das Adenosin unverändert geblieben oder eine Aufspaltung in Hypoxanthin eingetreten, so müßte sich mit Hilfe überlebender Pankreasschnitte der ganze dem Adenosin entsprechende Purinwert in Form von Harnsäure finden lassen. Tatsächlich zeigte sich in 4 Versuchen immer ein wechselnder Fehlbetrag an Purin, der dafür spricht, daß ein Aufbau des Adenosins zu Adenylsäure stattgefunden hat, da Adenylsäure von Pankreasschnitten nicht zu Harnsäure abgebaut werden kann.

Für eine Synthese der Adenylsäure aus Adenin über Adenosin in der Taubenleber sprechen Versuche, bei denen der Puringehalt mit zunehmender Versuchsdauer bestimmt wurde. Wir bestimmten den Puringehalt mit der Pankreasmethode nach einer halben Stunde und fanden einen bestimmten Harnsäurewert. Da nun Taubenpankreas weder Adenin noch Adenylsäure, wohl aber Adenosin zu Harnsäure abzubauen vermag, müssen wir an-

nehmen, daß der hier gefundene Harnsäurewert für eine Adenosinbildung aus ungefähr 10% des zugesetzten Adenins spricht. Wird die Purinbestimmung mit Taubenpankreasschnitten mit den gleichen Lösungen erst nach 1 Stunde ausgeführt, so zeigt sich nur noch ein ganz geringer Wert, ein Beweis dafür, daß die Lösung nach 1 Stunde kaum mehr Purinkörper enthielt, die von Pankreas in Harnsäure umgewandelt werden können, also kein Adenosin oder eventuell abgespaltenes Hypoxanthin. Diese Ergebnisse lassen sich wieder nur mit einer Adenylsäuresynthese aus Adenin über Adenosin erklären.

Eine Begünstigung der Synthese durch Zusatz verschiedener Zucker (l + Ribose, l + Galaktose, l + Glukose) konnte nicht nachgewiesen werden, was zu der Annahme zwingt, daß der Eigengehalt der Taubenleberschnitte an Kohlehydraten für den Einbau des Ribose-Moleküls vollkommen ausreicht.

Ein weiterer Versuch mit Adenin und Taubenleberschnitten, bei dem nach Enteiweißung mit Sulfosalizylsäure die Purine durch Fällung mit ammonikalischer Silberlösung bestimmt wurden, zeigt: 1. in der einen Hälfte der Lösung nach Abzug des Leerversuches ein deutliches Defizit an zugesetztem Adenin und 2. in der anderen Hälfte der Lösung nach Abzug des Leerversuches und nach Aufspaltung der gebundenen Purine mit 2%iger Schwefelsäure innerhalb der Fehlergrenze einen Purinwert, der dem zugesetzten Adenin fast entspricht. Diese Versuchsresultate berechtigen uns zu der Annahme, daß Adenin mit überlebenden Taubenleberschnitten entweder zu Adenosin oder Adenylsäure synthetisiert wird.

Beschreibung der Versuche.

I. Methodik.

1. Fällung mit Kupfersulfat und Natriumbisulfit.

Die zu untersuchenden phosphatpufferhaltigen Lösungen, die nie mehr als höchstens 8 mg Purinstickstoff enthielten, wurden, wenn nötig, neutralisiert, mit 1 g Natriumacetat und mit 2 ccm 40%iger Natriumbisulfitlösung versetzt, zum Sieden erhitzt und mit 2 ccm 10%iger Kupfersulfatlösung gefällt und 3 Minuten lang vorsichtig gekocht. Der Niederschlag wurde quantitativ auf ein Filter gebracht und 3 mal mit dest. Wasser ausgewaschen. Dann wurde er mit einem Trichter in einen Kjeldahlkolben abgespritzt, mit 1 ccm conc. Schwefelsäure bis zur Farblosigkeit verascht und unter Vorlage von n/100 Schwefelsäure nach Kjeldahl bestimmt.

2. Fällung mit ammoniakalischer Silbernitratlösung.

Die ammoniakalische Silbernitratlösung wurde hergestellt nach Hoppe-Seyler-Thierfelder, Physiol. u. pathol. chem. Analyse 1924, S. 865, Fußnote 2. Die zu untersuchenden Lösungen wurden mit 2 ccm 35%igen Ammoniaklösung versetzt, dann mit 3 ccm obiger ammoniakalischer Silbernitratlösung gefällt und über Nacht stehen gelassen. Sodann wurde der Niederschlag quantitativ auf ein Filter gebracht und 3 mal mit ammoniakhaltigem Wasser gewaschen, der Niederschlag in einen Kjeldahlkolben, der eine Messerspitze Baryumkarbonat enthielt, abgespritzt, so lange gekocht, bis sämtliches Ammoniak entwichen war, dann mit $1\,^1/_2$ ccm concentr. Schwefelsäure verascht und wie oben nach Kjeldahl bestimmt.

3. Bestimmung von freien neben gebundenen Purinen.

Die eine Hälfte der Lösung wurde zur Fällung der freien Purine mit 2 ccm 35%igem Ammoniak und 3 ccm ammoniakalischer Silbernitratlösung versetzt und über Nacht stehen lassen und der Niederschlag nach I, 2 weiterbehandelt.

Die andere Hälfte der Lösung wurde zur Ueberführung der gebundenen Purine in freie Purine 4 Stunden lang in 2%iger Schwefelsäure über der freien Flamme und Rückfluß gekocht, darauf der Purinstickstoff wie üblich bestimmt. Nach Abzug des Stickstoffwertes für die freien Purine ergab sich der gebundene Purinstickstoffgehalt der Lösung.

4. Bestimmung der freien Purine (+ Nucleoside) mit überlebenden Taubenpankreasschnitten.

Vergleiche Lit. 2.

5. Gewebsschnittversuche.

Die zu untersuchende Substanz wurde in einer Konzentration von 30—40 mg% in Phosphatpufferlösung von ph 7,8 oder 8,0 gelöst, mit ca. 600 mg Organschnitten auf 10 ccm Lösung versetzt. (Herstellung der Organschnitte vgl. Hoppe-Seyler's Z. 221, 221 (1933).) Dann wurde meist 2 Stunden bei 40° im Thermostaten in einem Kölbchen geschüttelt, die Lösung darnach aufgekocht und enteiweißt.

6. Enteiweißung.

Die Enteiweißung erfolgte anfangs mit gleichen Mengen 1,55%iger Uranylacetatlösung, später mit 5 ccm 20%iger Sulfosalizylsäurelösung für 50 ccm Lösung, da die Uranylacetatfällung sich wegen der Adsorption von Purinen als ungeeignet erwies.

Hierauf wurde vor der Fällung der Purine nach Neutralisation mit Natronlauge auf 20—30 ccm eingeengt und anschließend wie unter I, 2 und 3 beschrieben eine Purinbestimmung ausgeführt.

II. Versuchsergebnisse.

1. Fällung mit $CuSO_4$ und $NaHSO_3$.

a) Freie Purine:

Adenin — 15 mg Adenin in 50 ccm Phosphatpuffer ph 8,3
20 ccm der Lösung, wie unter I, 1 behandelt
verbraucht: 22,5 n/100 Sre. Gef: 3,15 Ber: 3,11 mg N

Guanin — 15 mg Guanin in 50 ccm Phosphatp. ph 8,3
20 ccm der Lösung, wie unter I, 1 behandelt
verbraucht: 21,45 n/100 Sre. Gef: 3,0 Ber: 2,79 mg N

Hypoxanthin — 15 mg Hypoxanthin in 50 ccm Phosphatp. ph 8,3
20 ccm der Lösung, wie unter I, 1 behandelt
verbraucht: 17,65 n/100 Sre. Gef: 2,47 Ber: 2,47 mg N

Xanthin — 15 mg Xanthin in 50 ccm Phosphatp. ph 8,3
20 ccm der Lösung, wie unter I, 1 behandelt
verbraucht: 15,1 n/100 Sre. Gef: 2,12 Ber: 2,21 mg N

b) Nucleoside:

Adenosin — 10 mg Adenosin in 15 ccm Phosphatp. ph 8,3
wie unter I, 1 behandelt
α) verbraucht: 1,75 n/100 Sre. Gef: 0,25 (!) Ber: 2,38 mg N
β) „ 0,3 n/100 Sre. Gef: 0,05 (!)
wie unter I, 3 nach Säurespaltung
verbraucht: 17,1 n/100 Sre. Gef: 2,39

Guanosin — 10 mg Guanosin in 15 ccm Phosphatp. ph 8,3
wie unter I, 1 behandelt
α) verbraucht: 8,35 n/100 Sre. Gef: 1,17 (!) Ber: 2,19 mg N
β) „ 5,45 n/100 Sre. Gef: 0,76 (!)
wie unter I, 3 nach Säurespaltung
verbraucht: 15,5 n/100 Sre. Gef: 2,17

c) Adenylsäure:

20 mg Muskeladenylsäure in 50 ccm aqua dest.
wie unter I, 1 behandelt
verbraucht: 0,5 n/100 Sre. Gef: 0,07 (!) Ber: 4,04 mg N
20 mg Hefeadenylsäure in 50 ccm aqua dest.
wie unter I, 1 behandelt
verbraucht: 2,7 n/100 Sre. Gef: 0,38 (!) Ber: 4,04 mg N

2. Fällung mit ammoniakalischer $AgNO_3$-Lsg.

a) Freie Purine:

Adenin 15 mg Adenin in 50 ccm Phosphatp. ph 8,3
20 ccm der Lösung, wie unter I, 2 behandelt
verbraucht: 19,5 n/100 Sre. Gef: 2,93 Ber: 3,11 mg N

Guanin 15 mg Guanin in 50 ccm Phosphatp. ph 8,3
20 ccm der Lösung, wie unter I, 2 behandelt
verbraucht: 20,5 n/100 Sre. Gef: 2,87 Ber: 2,79 mg N

Hypoxanthin 15 mg Hypoxanthin in 50 ccm Phosphatp. ph 8,3
20 ccm der Lösung, wie unter I, 2 behandelt
verbraucht: 17,2 n/100 Sre. Gef: 2,41 Ber: 2,47 mg N

Xanthin 15 mg Xanthin in 50 ccm Phosphatp. ph 8,3
20 ccm der Lösung, wie unter I, 2 behandelt
verbraucht: 15,1 n/100 Sre. Gef: 2,12 Ber: 2,21 mg N

b) Adenosin:

wie unter I, 2 keine sichtbare Fällung
wie unter I, 3 nach Säurespaltung
verbraucht: 16,0 n/100 Sre. Gef: 2,24 Ber: 2,38 mg N

c) Adenylsäure:

wie unter I, 2 keine Fällung

d) Trennung von Adenosin von freien Purinen:

α_1) 10 mg Adenosin, je 3 mg Adenin, Guanin, Hypoxanthin und Xanthin, in 60 ccm Phosphatp. ph 8,3
wie unter I, 2 behandelt
verbraucht: 36,9 n/100 Sre. Gef: 5,17 Ber: 5,29 mg N f. freie Purine

Filtrat mit H_2SO_4 angesäuert, Ag durch H_2S entfernt, dann nach Neutralisation Säurespaltung wie unter I, 3, dann wie unter I, 2
verbraucht: 15,37 n/100 Sre. Gef: 2,15 Ber: 2,38 mg N f. Adenosin

α_2) Ansatz wie unter α_1), wie unter I, 2 behandelt
verbraucht: 38,7 n/100 Sre. Gef: 5,42

β_1) Ansatz wie unter d α_1 sofort Säurespaltung wie unter I, 3 beschrieben, dann wie unter I, 2 behandelt
verbraucht: 54,9 n/100 Sre. Gef: 7,68 Ber: 7,67 mg N f. freie Purine + Adenosin

β_2) Ansatz wie unter d α_1) und dann weiter wie β)
verbraucht: 53,7 n/100 Sre. Gef: 7,54

3. Einfluß der Enteiweißung mit Uranylacetat.

Bei vorheriger Behandlung von Purin-Phosphatpufferlösungen mit gleichen Mengen 1,55%igen Uranylacetatlösungen zeigte sich bei Adenin nach Silberfällung, wie unter I, 2 beschrieben, ein Defizit von 25%, bei Hypoxanthin von 3% (Fehlergrenze) und bei Muskeladenylsäure von 97,5% (fast quantitative Ausfällung durch Uranylacetat).

4. Spaltung von Adenosin mit Taubenleberschnitten.

Leerversuch: 15 mg l + Alanin in 50 ccm Phosphatp. ph 8,0
mit 3000 mg Tb-Leber 2 Std. geschüttelt
Vollversuch wie Leerversuch + 20 mg Adenosin nach
Fällung mit ammoniakalischer Silberlösung
verbraucht: 36,15 n/100 Sre. Gef: 4,82 Ber: 4,06 mg N
nach Abzug d. L.V.

5. Hemmung der Spaltung durch Adenin.

Ansatz I: 5 mg Adenin 15 mg l + Alanin in 50 ccm Phosphatp. ph 8,0
mit 3500 mg Tb-Leber 2 1/2 Std. geschüttelt
nach Fällg. mit ammon. $AgNO_3$ Gef: 3,19 mg Purin N
Ansatz II: 20 mg Adenosin, 15 mg l + Alanin,
wie I behandelt Gef: 4,04 mg Purin N
Ansatz III wie II + 5 mg Adenin Gef: 5,32 mg Purin N
Hemmung Defizit: 1,91 mg
Ansatz I: 1 mg Muskeladenylsäure in 10 ccm Phosphatp. ph 7,8
mit 500 mg Tb-Niere 3 Std. geschüttelt,
Purin-Harnsäure bestimmt mit Taubenpankreas Gef: 5,8
Ansatz II wie I + 1 mg Adenin Gef: 3,9
Defizit: 1,9

6. Adenosin + Taubenleber.

Leerversuch: 30 mg l — Alanin in 100 ccm Phosphatp. ph 7,8
mit 5500 mg Tb-Leber 2 Std. geschüttelt,
Purin-Harns. bestimmt mit Taubenpankreas Gef: 4,0 mg%
Vollversuch wie I + 10 mg Adenosin Gef: 8,5 mg%
Defizit: 4,5
Purinbestimmung mit Tb-Pankreas, wenn 10 mg Adenosin
nach dem Aufkochen zum Leerversuch zugesetzt: = 6,5 mg%
Defizit: 2,0

7. Adenin + Taubenleber.

Leerv. I: 15 mg l + Alanin in 50 ccm Phosphatp. ph 8,0
mit 3600 mg Tb-Leber $^1/_2$ Std. geschüttelt Gef: 0,31 mg N
Vollv. I: wie I L + 10 mg Adenin Ber: 5,18 Gef: 5,40 mg N
nach Abzug
Leerv. II: wie I L, aber 1 Stunde geschüttelt Gef: 0,17 mg N
Vollv. II: wie II V, „ 1 „ „ Gef: 6,17 mg N
Leerv. III: 30 mg l + Alanin in 100 ccm Phosphatp. ph 8,0
mit 7200 mg Tb-Leber 2 Std. geschüttelt
Hälfte Gef: 1,68 mg N
Hälfte nach Säurespaltung Gef: 2,31 mg N
Vollv. III: wie III L + 20 mg Adenin Gef: 4,86 mg N
nach Säurespaltung Gef: 4,43 mg N

Purinbestimmung mit 400 mg Tb-Pankreas von
2 ccm Lsg. I Vollv. Gef: 1,8
2 ccm Lsg. II Vollv. Gef: 0,65
2 ccm Lsg. III Vollv. Gef: ∅

Zusammenfassung.

Die genaue Nachuntersuchung der von Thannhauser und Czoniczer angegebenen Methode der Bestimmung von freien und gebundenen Purinen ergab, daß nicht, wie diese Autoren behaupten, durch Kupfersulfat freie Purine zusammen mit Mononucleotide und Nucleosiden ausgefällt werden. Mit Kupfersulfatlösung gelingt eine quantitative Ausfällung nur bei freien Purinen, zusammengesetzte Purine werden nur zum Teil ausgefällt.

Die Fällung der freien Purine gelingt auch mit ammoniakalischer Silbernitratlösung quantitativ. Adenylsäure und Adenosin werden gar nicht gefällt, so daß es gelingt, Adenylsäure und Adenosin mit Hilfe ammoniakalischer Silbernitratlösung von sämtlichen freien Purinen abzutrennen. Nach Aufspaltung der zusammengesetzten Purine mit Schwefelsäure gelingt ihre Bestimmung in Form von freien Purinen sowohl mit Kupfersulfat als auch mit ammoniakalischer Silbernitratlösung.

Durch Behandlung von Adenosin mit überlebenden Taubenleberschnitten konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß dieses durch Phosphorilierung in der Taubenleber in geringer Menge zu Adenylsäure synthetisiert wird. Weiterhin sprechen Gewebsschnittversuche dafür, daß Adenylsäure in der Taubenleber aus Adenin über Adenosin entstehen kann.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Schuler für die freundliche Ueberlassung des Themas, Herrn Dr. W. Reindel für die stets bereitwillig erteilten Ratschläge bei der praktischen Durchführung der Arbeit und vor allem Herrn Prof. Dr. L. R. Müller für das in entgegenkommender Weise übernommene Referat herzlich danken.

Literatur:

1. K. Zipf: Arch. f. exp. Path. 160, 579 (1931).
2. v. Euler: Hoppe-Seyler's Zs. f. physiol. Chemie 194, 260 (1931).
3. H. J. Deuticke: Hoppe-Seyler's Zs. f. phys. Chem. 192, 193 (1930).
4. W. Schuler und W. Reindel: Hoppe-Seyler's Zs. f. phys. Chemie 221, 209 (1933).
5. a) A. Lehmer: Dissertation Erlangen 1935.
   b) W. Schuler und W. Reindel: Hoppe-Seyler's Zs. f. phys. Chem. 234, 74 (1935).
   c) J. Weber und W. Schuler: Z. f. exp. Med.
6. S. J. Thannhauser und Czoniczer: Hoppe-Seyler's Zs. f. phys. Chem. 110, 305 (1920).
7. G. Schmidt: Hoppe-Seyler's Zs. f. phys. Chem. 208, 225 (1932).
8. S. Edlbacher und P. Zucker: Hoppe-Seyler's Zs. f. phys. Chem. 240, 78 (1936).
9. W. Schuler und W. Reindel: Hoppe-Seyler's Zs. f. phys. Chem. 234, 63 (1935).

Lebenslauf.

Am 4. November 1911 wurde ich als Sohn des Zimmermeisters und Baugeschäftsinhabers Johann Gumprecht und seiner Ehefrau Anna, geb. Ringel, zu Frauenaurach geboren.

Vom sechsten bis zum zehnten Lebensjahr besuchte ich die Volkshauptschule Frauenaurach. Anschließend trat ich im Jahre 1922 in die Oberrealschule Erlangen ein, wo ich im März 1931 die Reifeprüfung bestand. Ich widmete mich dann dem Studium der Medizin. Meine fünf vorklinische Semester verbrachte ich in Erlangen und legte hier auch die ärztliche Vorprüfung ab. In den ersten beiden klinischen Semestern studierte ich in Breslau; zuletzt studierte ich wiederum in Erlangen und bestand am 29. Oktober 1936 meine ärztliche Prüfung.

Anschließend war ich als Medizinalpraktikant am Evangel. Krankenhaus in Oldenburg i. O., wo ich auch jetzt als Assistent beschäftigt bin.